

家族性高コレステロール血症における低比重 リポ蛋白受容体生合成に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

藤 田 一

(平成2年2月6日受付)

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 10患者における低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 受容体の異常について、受容体蛋白生合成の観点から検討を行った。対象者の皮膚線維芽細胞を培養し、¹²⁵I-LDL の結合、取り込み、異化を測定して LDL 受容体活性を評価し、ホモ接合体とヘテロ接合体を区別した。次に、[³⁵S] メチオニンで細胞の蛋白を標識し、単クローン抗体 IgG-C7 を用いて LDL 受容体蛋白を分離し、分子量の変化で受容体の合成過程を検討した。ホモ接合体性 FH 4例は、蛋白がまったく生成されないもの (蛋白合成欠損型, null alleles) 1例、生成された蛋白の細胞膜表面への移動が障害されているもの (転送障害型, transport-deficient alleles) 1例、細胞膜表面での LDL との結合が障害されているもの (結合障害型, binding-deficient alleles) 2例に分類され、ヘテロ接合体性 FH 6例は、転送障害型2例、蛋白合成欠損型または結合障害型4例に分類された。LDL 受容体遺伝子の18のエクソンのうち第15エクソンが欠損している FH-Tonami-1 は正脂血症者よりも20キログルトン小さい異常な前駆体はできるが、この前駆体が成熟体にならないで細胞内にとどまり速やかに分解される転送障害型と考えられた。第2エクソンと第3エクソンが欠損している FH-Tonami-2 は LDL との親和性が正脂血症者の約40パーセントの結合障害型と考えられた。以上より、日本人 FH における LDL 受容体異常は非常に多様であると思われた。

Key words familial hypercholesterolemia (FH), low density lipoprotein (LDL) receptor, biosynthesis of LDL receptor protein, FH-Tonami-1, FH-Tonami-2

家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia, FH) は、幼少期より高コレステロール血症をきたし、虚血性心疾患を高率に合併する常染色体優性遺伝の疾患である。血中のコレステロールは主に低比重リポ蛋白 (low density lipoprotein, LDL) により運搬されているが、本症ではこの LDL を細胞内に取り込む時に必要な LDL 受容体に異常があるため、血中のコレステロールが増加することが明らかにされている^{1,2)}。LDL 受容体遺伝子は第19番染色体の短腕近位部に存在して³⁾18のエクソンから成り^{4,5)}、対立遺伝

子の一方のみが異常であるヘテロ接合体と両方とも異常であるホモ接合体が存在する。LDL 受容体の異常はその合成過程から①蛋白がまったく生成されないもの (蛋白合成欠損型, null alleles)、②生成された蛋白の細胞膜表面への移動が障害されているもの (転送障害型, transport-deficient alleles)、③細胞膜表面での LDL との結合が障害されているもの (結合障害型, binding-deficient alleles)、④結合した LDL を細胞内へ取り込む段階が障害されているもの (取り込み障害型, internalization-defective alleles) の4種類に大別

Abbreviations: CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane-sulfonate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGF, epidermal growth factor; FH, familial hypercholesterolemia; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; kb, kilobasepairs; kd, kilodaltons; HMG-CoA,

されている⁹⁾。FH の LDL 受容体異常を蛋白レベルで検討することにより、LDL 受容体の構造と機能の関係を明らかにするとともに、FH の病態が明らかとなり、治療法の選択にも有用であると思われる。本研究では、日本の FH における LDL 受容体異常を検討し、その分類を行った。さらに、遺伝子の異常部位がすでに明らかとなっている FH (FH-Tonami-1⁷⁾, FH-Tonami-2⁸⁾) において受容体の性質を検討し、受容体の構造と機能との関連を明らかにした。

材料および方法

I. 材 料

¹²⁵I (>350mCi/ml), L-[³⁵S]メチオニン (>800Ci/mmol), EN³HANCE は New England Nuclear (Boston, USA) より購入した。IgG-C7 (clone C7) は Amersham (Buckinghamshire, England) より、ヒツジ抗マウス IgG (No. 0211-0081) は Cappel Laboratories (West Chester, USA) より購入した。Pronase (Streptomyces griseus 由来, B grade) は Calbiochem-Behring (La Jolla, USA) より購入し、phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin, 3-[(cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS) は Sigma Chemical Company (St. Louis, USA) より購入した。

II. 方 法

1. 細胞

臨床的に FH と診断された患者10例および正脂血症者3例の皮膚線維芽細胞を使用した。FH の診断は、馬淵らの基準⁹⁾に基づいて行った。即ち、①血清総コレステロールが250mg/dl以上で、腱黄色腫を認めること、②1親等に本症があり、血清総コレステロールが250mg/dl以上であることのいずれかを満足していた。

皮膚線維芽細胞は、対象者の前腕または上腕より径5mm程度の皮膚片を採取し、プラズマクロット法¹⁰⁾に従い初代培養し、5%炭酸ガス孵卵器にて5%ウシ胎児血清 (fetal calf serum) (Gibco, Grand Island, USA) と5%ウシ血清 (bovine serum) (Gibco) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (日水製薬, 東京) で継代培養した。実験は5から20代の間で行い、75cm²の組織培養フラスコ

(Falcon, Oxnard, USA) にいっぱい増殖した細胞に0.05%トリプシンを含む0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 液を1ml加えて単離細胞浮遊液とし、直径60mmのシャーレ (Falcon) に15万個の細胞を植え込み、3日ごとに培養液3mlを交換し、5から8日間培養後に行った。

2. LDL およびリポ蛋白欠除血清

16時間以上絶食の正常人より早朝採血し、その血液から Havel らの方法¹¹⁾に従い超遠心器 L8-55 (Beckman, California, USA) およびローター 50.3Ti (Beckman) を用いて比重1.020から1.050g/mlの分画を採取して LDL とし、その濃度は蛋白量として表現した。¹²⁵I-LDL は緩衝液 A (0.15M NaCl, 0.3mM EDTA, pH 7.4) で2回以上透析した LDL を MacFarlane の ICl 法の変法¹²⁾にて標識して作成し、放射活性の95%以上が LDL の蛋白と結合していることを確認した。正常人より採血し、その血液から超遠心にて比重1.215g/ml以上の分画を採取してリポ蛋白欠除血清 (lipoprotein-deficient serum, LPDS) とした。これらの材料は緩衝液 A にて2回以上透析後実験に使用した。

3. LDL 受容体活性の測定

LDL 受容体活性は皮膚線維芽細胞における¹²⁵I-LDL の結合、取り込み、異化を Goldstein ら¹³⁾¹⁴⁾, Haba ら¹⁵⁾の方法に従って以下のように測定した。LPDS を5%含む DMEM 2.5ml にて細胞を48時間培養した後、¹²⁵I-LDL 10μg/ml (比放射能 33 から100cpm/μg) を含む5% LPDS 含有 DMEM 1.5ml を加えて6時間培養した。以後の実験は4℃で行った。細胞を6mgのウシ血清アルブミンを含む3mlの緩衝液 B (50mM trishydroxymethylaminomethane (Tris)-HCl [pH 7.4], 0.15M NaCl) で5回洗い、さらに3mlのウシ血清アルブミンを含まない緩衝液 B で1回洗った後、2mlの緩衝液 C (10mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) [pH 7.4], 50mM NaCl, 4mg/ml デキストラン硫酸) を加え1時間後に細胞表面より浮遊した¹²⁵I-LDL の放射活性を結合とした。残った細胞を緩衝液 B で洗った後、1mlの0.1N NaOH にて溶解し得られた放射活性を取り込みとし、この溶液の蛋白量を測定して、細胞の蛋白量とした。培養液に0.375mlの50%ト

3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; LDL, low density lipoprotein; LPDS, lipoprotein-deficient serum; ND, not detected; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate; Tris, trishydroxymethylaminomethane; WHHL rabbit, Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit

リクロー酢酸を加えて 3000rpm で30分間遠心して得られた上清に 10 μ l の40% KI と 40 μ l の30%過酸化水素を加え 5 分間室温で置いた後、2ml のクロホルムを加えて 1500rpm で30分間遠心して分離された水溶液層の放射活性を異化とした。測定は二重に行い、特異的な受容体活性を検討するため、¹²⁵I-LDL のみを加えて得られた測定値より、さらに 300 μ g/ml の LDL を加えても抑制されない非特異的と考えられる測定値を差し引いて計算した。結果は同時に実験を行った正常対照の測定値に対する割合で示した。

LDL 受容体と LDL の親和性は、以下のように測定した¹⁶⁾。LPDS を 5%含む DMEM 2.5ml にて細胞を 37°Cで48時間培養し、さらに 4°Cに30分間維持した後、種々の濃度の ¹²⁵I-LDL を含む培養液 A (重曹を含まない DMEM, 10mM HEPES [pH 7.4], 5% LPDS) と 4°Cで2時間維持した。細胞をウシ血清アルブミンを含んだ緩衝液 B で 6 回洗い、さらにウシ血清アルブミンを含まない緩衝液 B で 1 回洗った後、1ml の 0.1N NaOH にて溶解し放射活性と蛋白量を測定した。測定は二重に行い、特異的な結合を検討するため、¹²⁵I-LDL のみを加えて得られた測定値より、さらに20倍量の LDL を加えても抑制されない非特異的と考えられる測定値を差し引いて計算した。細胞および LDL の蛋白量は Lowry 法¹⁷⁾にて測定した。

4. 抗体

0.15mg の単クローン抗体 IgG-C7¹⁸⁾を 330 μ l の蒸留水に溶解し、350 μ l の緩衝液 D (50mM Tris-HCl

[pH 8.0], 200mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% [v/v] Nonidet-P40) を加え、さらに 12mg のヒツジ抗マウス IgG を 300 μ l の蒸留水で溶解して加えて室温で 30分置き、その後 4°Cで 1 日置いた。沈澱に緩衝液 D を 2ml 加えて再浮遊させ、1000rpm で 1 分間遠心した。これを 2 回繰り返す、得られた免疫複合体に 0.5ml の緩衝液 D を加えた。

5. LDL 受容体の合成過程

皮膚線維芽細胞における LDL 受容体の合成過程は、Tolleshaug らの方法^{19,20)}に準じて以下のように行って検討した。LPDS を 5%含む DMEM 2.5ml で細胞を12時間培養後、LPDS を 5%含んだメチオニン欠除 DMEM (日研生物医学研究所、京都) に [³⁵S] メチオニン (60 から 250 μ Ci/ml) を加えた培養液 1.5ml で 2 時間培養し (パルス・ラベル)、一部の細胞ではさらに LPDS を 5%含む通常の DMEM 1.5ml を加えて数時間培養した (チェイス)。以後の実験はすべて 4°Cで行った。3ml の緩衝液 E (10mM HEPES [pH 7.4], 0.15M NaCl, 2mM CaCl₂) で洗った細胞を、0.2ml の緩衝液 F (10mM HEPES [pH 7.4], 200mM NaCl, 2mM CaCl₂, 2.5mM MgCl₂, 1mM 非標識メチオニン, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride in 0.25% [v/v] dimethylsulfoxide, 0.1mM leupeptin, 1.5%[v/v] Triton X-100) で溶解し、超遠心器 L8-55 およびローター 42.2Ti (Beckman) を用いて 150,000 \times g で30分間遠心した。この上清 500 μ l に免疫複合体を含む緩衝液 D100 μ l を加え、1 時間混合

Table 1. Activities and biosynthesis of LDL receptors in fibroblasts from patients with familial hypercholesterolemia

Patient	Receptor-bound ¹²⁵ I-LDL	Internalized ¹²⁵ I-LDL	Degraded ¹²⁵ I-LDL	Biosynthesis of the receptor		
				Precursor	Mature	Processing
FH homozygote						
YS	16%	9%	1%	ND	ND	—
KT	2%	4%	1%	120kd	ND	Impaired
EK	5%	3%	3%	120kd	160kd	Normal
HaY	62%	43%	66%	ND	ND	Normal ?
FH heterozygote						
HiY	88%	75%	80%	100kd	ND	Impaired
KI	64%	25%	56%	150kd	ND	Impaired
YJ	94%	63%	72%	120kd	160kd	Normal
HI	38%	29%	32%	120kd	160kd	Normal
KT	66%	27%	70%	120kd	160kd	Normal
SM	52%	27%	65%	120kd	160kd	Normal

Activities are shown with percentages of the same strain of normal control in each experiment. ND, not detected; kd, kilodaltons.

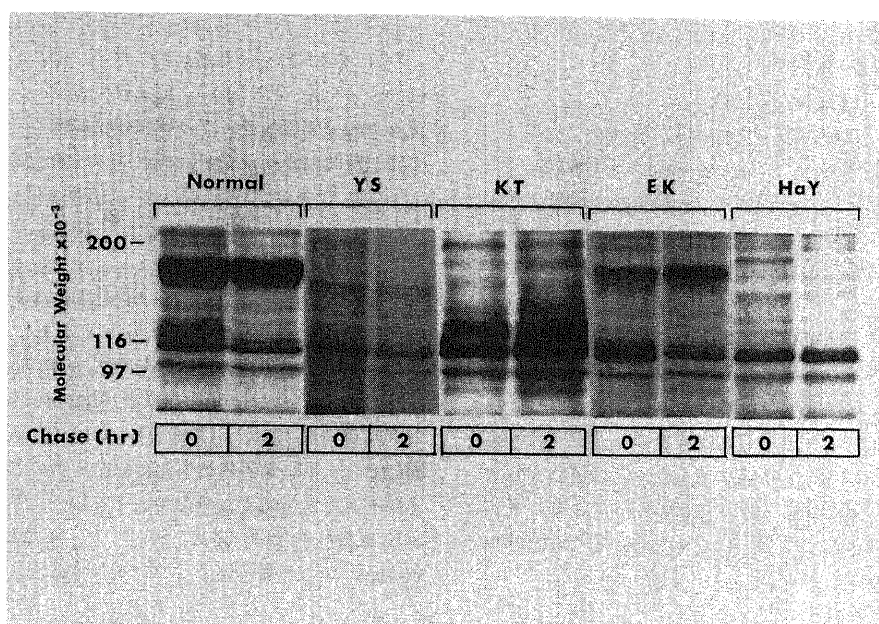


Fig. 1. ^{35}S -labeled LDL receptors in fibroblasts from a normal subject and subjects with homozygous FH. Fibroblasts were pulse labeled with [^{35}S] methionine for 2 hr, and followed by a 2-hr chase with unlabeled methionine. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and fluorography.

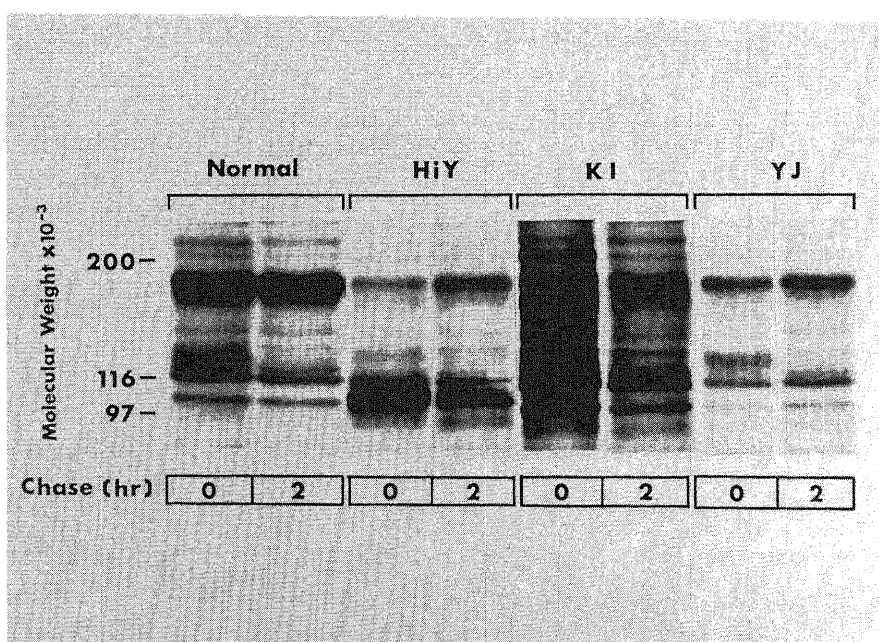


Fig. 2. ^{35}S -labeled LDL receptors in fibroblasts from a normal subject and subjects with heterozygous FH. Fibroblasts were pulse labeled with [^{35}S] methionine for 2 hr, and followed by a 2-hr chase with unlabeled methionine. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and fluorography.

した後、4層のショ糖液の最上層にのせ 2800rpm で20分間遠心した。すべてのショ糖液は 10mM Tris-HCl [pH 8.0] と 1mM phenylmethylsulfoxide を含み、各層は 1.2ml で以下に示すように構成した。

第1層 (最上層): 10%ショ糖, 0.5% CHAPS

第2層: 20%ショ糖, 0.2% Nonidet-P40, 0.5M NaCl

第3層: 30%ショ糖, 0.2% Nonidet-P40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)

第4層 (最下層): 40%ショ糖

遠心して得られた沈澱を 600 μ l の緩衝液 G (50mM Tris-HCl [pH 8.0], 2mM CaCl₂) で再浮遊させ 12,000rpm で20秒間遠心し、沈澱を 50 μ l の 8M 尿素, 0.2M dithiothreitol で溶解した。この溶液 25 μ l に緩衝液 H (20% [v/v] glycerol, 10% [v/v] 2-mercaptoethanol, 4.7% [w/v] SDS, 150mM Tris-HCl [pH 6.8]) を 25 μ l 加え、90°C に3分間置いた後0.1%の SDS を含む6%のポリアクリラミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) にかけた²⁰⁾。電気泳動は 25mA で6時間行い、分子量の標準としてミオシン, 200キログルトン (kilodaltons, kd); β ガラクトシダーゼ, 116kd; フォスフォリラーゼ b, 97kd; ウシ血清アルブミン,

66kd; オブアルブミン, 43kd (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用いた。電気泳動後のゲルを蛋白染色した後、EN⁺HANCE に90分間浸し、さらに蒸留水に60分間浸した。ゲル乾燥器で乾燥後、-80°C にて約72時間のオートラジオグラフィーを行った²⁰⁾。

成 績

I. LDL 受容体活性

¹²⁵I-LDL の結合、取り込み、異化のうち最も信頼性の高い異化を LDL 受容体活性とすると、臨床的に FH と診断された患者より得られた線維芽細胞の LDL 受容体活性は、正脂血症者に比べ80パーセント以下に低下していた (表 1)。このうち YS, KT, EK では LDL 受容体活性が正脂血症者の10パーセント以下と非常に低下しており、それ以外の7例では、LDL 受容体活性は、30から80パーセントであった。一般に、FH ホモ接合体の LDL 受容体活性は正常の10パーセント以下とされており、YS, KT, EK は FH ホモ接合体と考えられた。HaY は、サザンブロット法²⁰⁾による LDL 受容体遺伝子の解析で、正常より約10キロ塩基対 (kilobase pairs, kb) 小さな異常遺伝子を2個持つホモ接合体であることが明らかであるが、LDL 受容体活性は約60%と FH ヘテロ接合体の

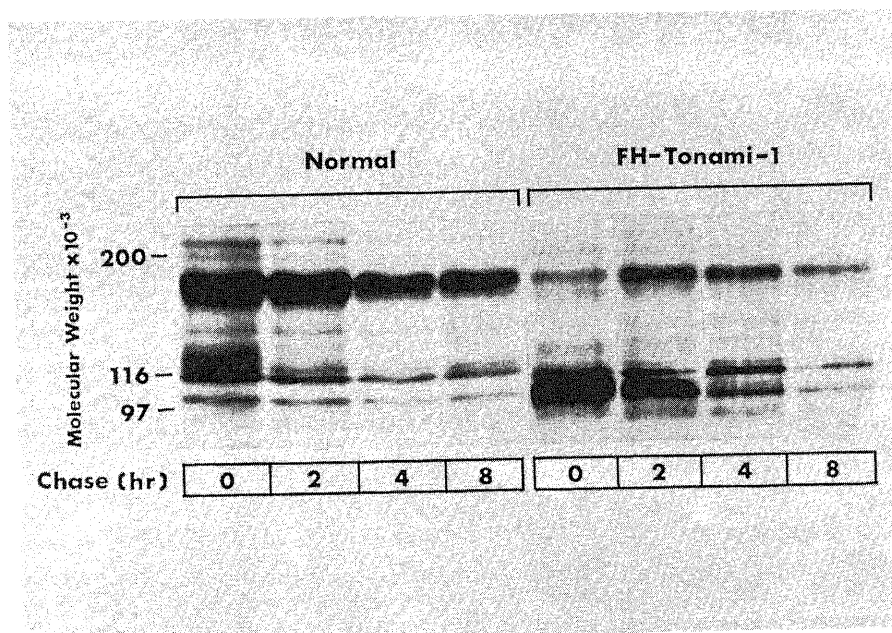


Fig.3. Time course for biosynthesis of LDL receptors in fibroblasts from a normal subject and FH heterozygote Tonami-1. The cell extracts were immunoprecipitated and subjected to SDS-PAGE, and the LDL receptor was detected by fluorography.

活性であった。FH ヘテロ接合体の LDL 受容体活性は正常の約50パーセントと言われており、HiY, KI, YJ, HI, KT, SM の6例は、FH ヘテロ接合体と考えられた。取り込み障害型では、結合は正常で取り込みと異化が低下する²⁰。今回の検討症例には、取り込み障害型は存在しなかった。

II. LDL 受容体の合成過程

1. 正脂血症者

正脂血症者の細胞では、2時間のパルス・ラベルにて分子量 120kd と 160kd の2本のバンドが認められた。非標識メチオニンで2時間チェイスすることにより、ラベルした蛋白がどのように変化するか観察したところ、120kd のバンドは消失し 160kd のバンドのみとなった(図1)。この 120kd のバンドは LDL 受容体遺伝子から作られた LDL 受容体の前駆体であり、これが細胞内の主としてゴルジ装置で O-結合糖などの糖鎖の付加を受けて分子量が 40kd 増加し、160kd の

成熟体となると考えられた²⁰。

2. ホモ接合体(表1, 図1)

YS では前駆体も成熟体も認められず、受容体蛋白がまったく生成されない蛋白合成欠損型と考えられた。KT では、120kd の前駆体は認められたが、チェイスをしても成熟体は認められなかった。これは、細胞内での糖鎖付加が障害されていることを示しており、受容体蛋白の細胞膜表面への移動が障害されている転送障害型と考えられた。KT では、前駆体と成熟体が正脂血症者と同様に認められたが、LDL 受容体活性が3パーセントと低下していることより、受容体蛋白は細胞膜表面まで到達するが LDL との結合が障害されている結合障害型と考えられた。HaY では前駆体も成熟体も認められなかったが、LDL 受容体活性が正常の約60パーセント認められており、以下の検討を加えた結果、結合障害型のホモ接合体と考えられた。

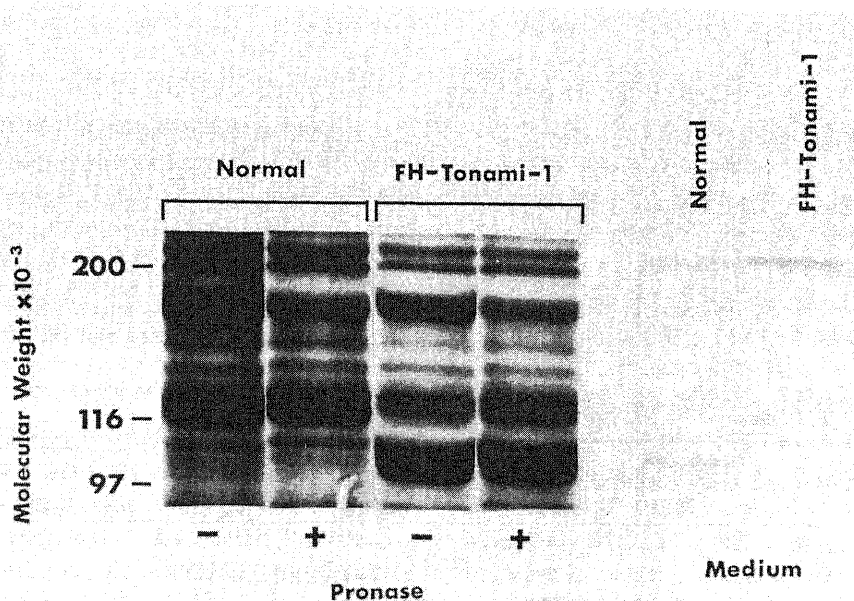


Fig. 4. Localization of LDL receptors from a normal subject and FH heterozygote Tonami-1. Fibroblasts were pulse labeled with [³⁵S] methionine for 2 hr. Then the medium was replaced with 1.5ml of buffer containing 10mM HEPES, 150mM NaCl and 2mM CaCl₂ at pH 7.4 in the absence or presence of 20 μ g/ml Pronase B. After incubation for 20 min at 37°C, Pronase activity was stopped by chilling the cells to 4°C and adding 1ml of ice-cold phosphate-buffered saline containing 25% (v/v) human lipoprotein-deficient serum, 25mM EDTA and 2mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The cells were scraped from the dish, centrifuged at 2000 rpm for 5 min and washed twice in phosphate-buffered saline. The cell extracts (left) and the medium (right) were immunoprecipitated and subjected to SDS-PAGE, and the LDL receptors were detected by fluorography.

3. ヘテロ接合体 (表1, 図2)

HiY では, 2時間のパルス・ラベルで正脂血症者で見られる 120kd と 160kd のバンド以外に, 約 100kd の異常バンドが認められた。さらに2時間チェイスするとこの異常バンドの濃度は低下したが, それ以外に異常なバンドは認められなかった。この 100kd のバンドは異常な前駆体で, それが成熟体とならない転送障害型と考えられた。同様に KI 例でも, 約 150kd の異常な前駆体を認めるが成熟体は認められず転送障害型と考えられた。それ以外の4例では, 正脂血症者と同様に 120kd と 160kd のバンドが認められた。このような例では, ヘテロ接合体であるために異常な受容体蛋白と正常な受容体蛋白が重なるため, 蛋白がまったく生成されない蛋白合成欠損型であるのか, 正常と同じ分子量の蛋白ができている結合障害型であるのかの区別は不可能であった。

III. 受容体の遺伝子異常と機能との関連

1. FH-Tonami-1

HiY の異常な LDL 受容体遺伝子は, サザンブロット法による分析で, エクソン15を含む約 6kb の部分欠損が存在することが明らかとなっており, この異常遺伝子は FH-Tonami-1 と命名されている⁷⁾。HiY は FH-Tonami-1 のヘテロ接合体であるが, FH-Tonami-1 では約 100kd の異常な前駆体が認められ, この前駆体は2時間のチェイスでも成熟体にならず, 細胞内での糖鎖付加が行われないと考えられた。チェイスの時間を, 4時間, 8時間と延長しても成熟体と考え

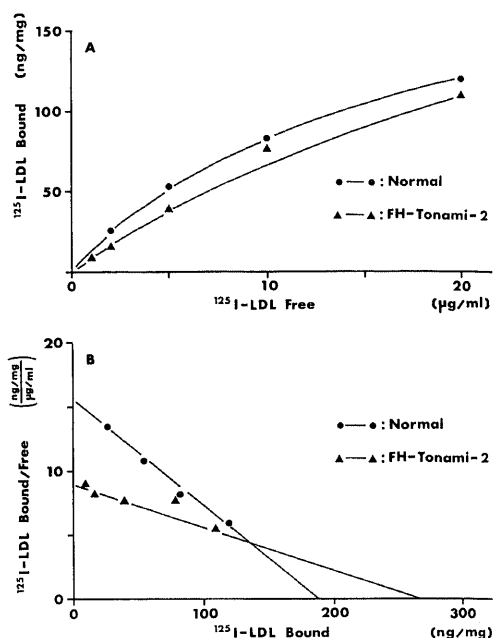


Fig. 5. Surface binding of ^{125}I -LDL in fibroblasts from a normal subject (●) and FH homozygote Tonami-2 (▲). After incubation for 48 hr in DMEM with 5% LPDS, medium containing ^{125}I -LDL (1, 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence or presence of a 20-fold excess of unlabeled LDL was added and the cells were incubated at 4°C for 2 hr. The cells were washed and dissolved in 0.1N NaOH for determination of the specific cell-associated ^{125}I -LDL. The data are shown with saturation curve (A) and Scatchard plot (B).

Table 2. No effect of 17-estradiol on activities of LDL receptors in fibroblasts from FH-Tonami-2

Patient and assay condition	Receptor-bound ^{125}I -LDL (ng/mg)	Internalized ^{125}I -LDL (ng/mg)	Degraded ^{125}I -LDL (ng/mg/6hr)
Normal			
ethanol only	34	76	1914
50ng/ml 17 β -estradiol in ethanol	32	50	2337
HaY(FH-Tonami-2)			
ethanol only	21	107	454
50ng/ml 17 β -estradiol in ethanol	13	83	303
KT(FH homozygote)			
ethanol only	0	17	124
50ng/ml 17 β -estradiol in ethanol	12	10	208

Cell monolayers were grown in dishes containing 3 ml of growth medium. On day 6, the monolayers received 2 ml of medium containing 5% LPDS and 0.1% ethanol with or without 50 ng/ml β -estradiol. Forty-eight hours later, the cells received 1.5ml of fresh medium containing 5% LPDS, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ^{125}I -LDL, and 0.1% ethanol with or without 50 ng/ml β -estradiol. After incubation for 6hr, surface-bound, internalized, and degraded ^{125}I -LDL were determined. Each value represents the average of duplicate incubations.

られるバンドは認められず、異常な前駆体のバンドの濃度は時間とともに低下し、8時間後にはほとんど認められなかった(図3)。

2時間のパルス・ラベル後、細胞表面を Pronase で処理すると、正脂血症者の 160kd のバンドの濃度は低下したが、120kd のバンドは不変であった(図4)。これは、160kd の成熟体は細胞表面に存在し、120kd の前駆体は細胞内に存在することを示している。FH-Tonami-1 の 100kd のバンドは不変であり、細胞内に存在すると考えられた。また、生成された受容体蛋白が培地中に放出されていないか調べるため2時間パルス・ラベル後の培地を用いて検討したところ、FH-Tonami-1 では 100kd の前駆体もその成熟体と考えられる蛋白も培地中には認められず、正脂血症者と同様の非特異的と考えられるバンドしか認められなかった(図4)。以上の検討により、FH-Tonami-1 では、正脂血症者よりも約 20kd 小さい異常な前駆体はできるが、この前駆体は糖鎖の付加を受けられず成熟体とならないで細胞内にとどまり速やかに分解されると考えられた。

2. FH-Tonami-2

HaY の異常な LDL 受容体遺伝子は、エクソン 2 と 3 を含む約 10kb の部分欠損を持つことが知られており、FH-Tonami-2 と命名されている⁹⁾。HaY は FH-Tonami-2 のホモ接合体である。エクソン 2 は、受容体蛋白では単クローン抗体 IgG-C7 が結合する部分であることが知られている²⁰⁾。本例の LDL 受容体合成過程の検討でバンドが認められなかったのは、受容体蛋白の選別に IgG-C7 を用いたためと考えられた。

これまで知られている FH ホモ接合体の LDL 受容体活性は正脂血症者の10%以下であるが、本例では約60パーセントの活性を認めた。本例の LDL 受容体と LDL との親和性を検討し、Scatchard の方法²¹⁾で図示すると、負の傾きで示される親和性は正脂血症者の約40パーセントであり、X切片で示される LDL 受容体の数は正脂血症者の150パーセントであった(図5)。以上より、FH-Tonami-2 は、LDL との親和性が正脂血症者の約40パーセントしかない異常な LDL 受容体ができている結合障害型と考えられた。

HaY は、妊娠時およびエストラジオール (estradiol) 投与時に著明な LDL コレステロールの低下を示していた²²⁾。本例の線維芽細胞で、培養液中にエストラジオールを添加して LDL 受容体活性を測定したが、非添加と比べて活性の増加は認められなかった(表2)。

考 察

FH は LDL 受容体遺伝子の異常によって起こる、常染色体優性遺伝の疾患である。そのホモ接合体は、約100万人に一人と非常に希であるが、ヘテロ接合体は、約500人に一人と単一遺伝子の異常による疾患としては最も頻度が高い²³⁾。若年より虚血性心疾患を高率に発症するため²⁴⁾、臨床的にも重要な疾患である。本症の診断には、一般に臨床所見および家系調査が用いられているが、他の高脂血症との鑑別やホモ接合体とヘテロ接合体の鑑別には、LDL 受容体活性の測定が重要である。これまでの報告では、ホモ接合体の LDL 受容体活性は正脂血症者の10パーセント以下であり、ヘテロ接合体の LDL 受容体活性は正脂血症者の約50パーセントである。しかし、今回検討した症例では、遺伝子の分析によりホモ接合体と確定している症例の LDL 受容体活性が正脂血症者の約60パーセントも存在した。したがって、LDL 受容体活性によってもホモ接合体とヘテロ接合体の鑑別ができない場合も存在すると考えられた。

LDL 受容体は、分子量 115kd の膜蛋白質で2分子の N-結合糖と18分子の O-結合糖を含んでいる²⁵⁾。SDS ポリアクリラミド電気泳動上の見かけの分子量が120kd の前駆体として粗面小胞体で合成され、ゴルジ装置で糖鎖の修飾を受け、見かけの分子量 160kd の成熟体となって細胞表面に運ばれる。細胞表面で LDL 受容体は、LDL 中のアポ蛋白 B と結合して、LDL を細胞内に取り込む。LDL 受容体の異常は、LDL 受容体の合成過程から①蛋白合成欠損型、②転送障害型、③結合障害型、④取り込み障害型の4種類に大別されている。今回の症例では、取り込み障害型以外の3種類の異常が認められた。しかも、同じ転送障害型と考えられた症例でも前駆体の大きさが異なり、日本人における LDL 受容体の異常は非常に多様であると考えられた²⁶⁾。

近年、細胞内におけるコレステロール生合成の律速酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素の選択的阻害剤が開発され、高コレステロール血症の治療に用いられている²⁷⁻³⁰⁾。FH ホモ接合体のうち、LDL 受容体蛋白が存在せず LDL 受容体活性が認められない症例では、血中のコレステロールを細胞が取り込めないためこの種の薬剤は禁忌である。一方、LDL 受容体蛋白が存在し LDL 受容体活性をわずかでも認める症例では、LDL 受容体活性を高めるため HMG-CoA 還元酵素阻害剤の適応がある。このように、LDL 受容体の活性を測定

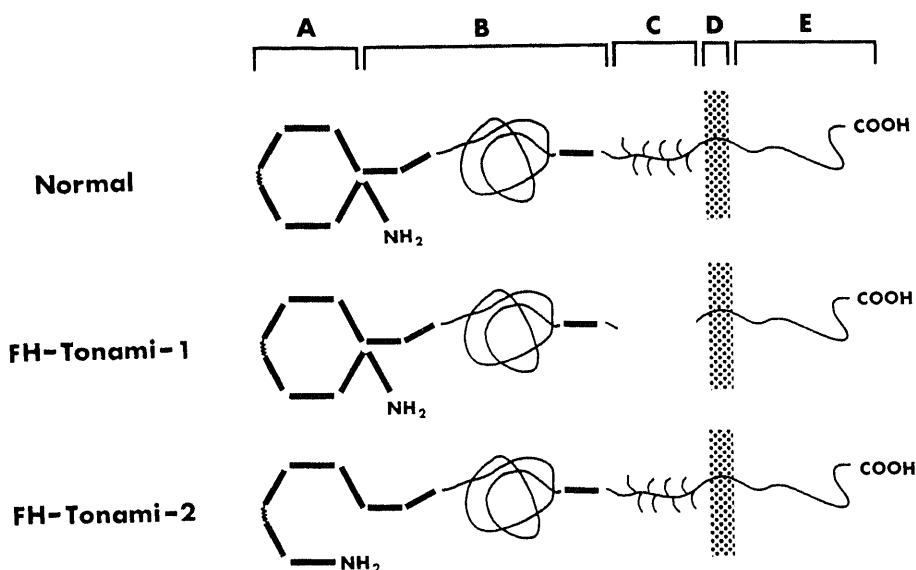


Fig. 6. Structural models of normal LDL receptor and mutant FH-Tonami-1 and FH-Tonami-2 receptors. A, ligand binding domain; B, EGF precursor homology domain; C, O-linked sugars domain; D, membrane-spanning domain; E, cytoplasmic domain.

し、LDL 受容体蛋白の合成過程を検討することは、FH の治療方法の選択に有用である。

Yamamoto らによって、LDL 受容体遺伝子の相補鎖 DNA (complementary DNA) がクローニングされ、その全一次構造が決定された³⁵⁾。この一次構造の解析により、LDL 受容体蛋白は、N 末端より A. リガンド結合ドメイン、B. 表皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) 前駆体相同ドメイン、C. O-結合糖結合ドメイン、D. 膜結合ドメイン、E. 細胞内ドメインの 5 つの異なるドメインから成ると考えられている (図 6)。LDL 受容体遺伝子の異常と蛋白レベルでの異常との関係は、主として Goldstein らのグループで、FH および人工的に欠損を作製した遺伝子の発現の検討によって、解明されてきた^{36)~39)}。それによると、リガンド結合ドメインの遺伝子異常は結合障害型になることが多く、膜結合ドメインや細胞内ドメインの異常は取り込み障害型になるなどの関連を認めている。

FH-Tonami-1 では、エクソン 15 が欠損しているが、この部分は蛋白では O-結合糖結合ドメインに相当する (図 6)。この部分が欠損しているため FH-Tonami-1 では正常よりも約 20kd 小さな 100kd の前駆体ができ、この前駆体は糖鎖の付加を受けられず成熟体とならずに細胞内にとどまり速やかに分解されるため LDL 受容体活性が低下すると考えられた (図 7)。

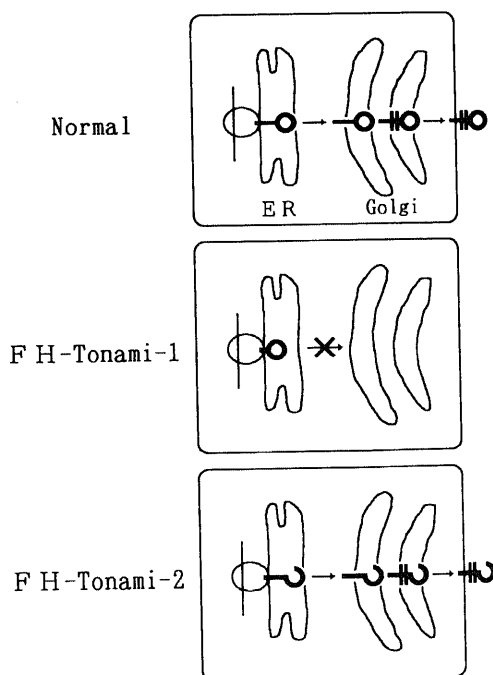


Fig. 7. Biosynthesis of LDL receptors in fibroblasts from a normal subject, FH-Tonami-1 and FH-Tonami-2. —○, normal precursor; —●, normal receptor; —○, precursor lacking O-linked sugars domain; —●, receptor partially lacking ligand binding domain; ER, endoplasmic reticulum; Golgi, Golgi complex.

Davis ら³⁹⁾は、O-結合糖結合ドメインの大部分が欠損した LDL 受容体遺伝子を人工的に作製し、トランスフェクションの手法を用いてその発現を検討した。その変異遺伝子では、100kd の前駆体が 120kd の成熟受容体となり、その LDL 受容体活性は正常であった。結論として彼らは O-結合糖結合ドメインが存在しなくても LDL 受容体の機能には変化がないとしている。彼らの結果と本症例との相違は、FH-Tonami-1 は、O-結合糖結合ドメインが、完全に欠損しているのに対し、彼らの欠損は不完全なためと考えられた。細胞膜蛋白や分泌蛋白は、主としてゴルジ装置で糖鎖の付加を受けるが、その意義については未だに良く知られていない。この問題の解明に FH-Tonami-1 は有用であるかもしれない。

リガンド結合ドメインは292個のアミノ酸から成り立っており、40アミノ酸からなる7個の反復配列を含んでいる。エクソン2と3の欠損している FH-Tonami-2 では、この7個の反復配列の第1番と第2番が欠損していると考えられている(図6)。この部分は単クローン抗体 IgG-C7 が結合する部分であるために、この症例では、IgG-C7 を用いた検討では LDL 受容体蛋白が証明されなかった。今後、LDL 受容体の他の部分に結合する抗体を使用して、LDL 受容体蛋白合成過程を検討することが必要である。LDL 受容体活性および LDL との親和性の検討から、FH-Tonami-2 では LDL 受容体の数は減少していないが、LDL との親和性が正常の約40%しかない異常な受容体ができているために、LDL 受容体活性が低下していると考えられた(図7)。Esser ら³⁹⁾は、人工的に作成した異常な LDL 受容体遺伝子を発現させ、遺伝子異常の部位と受容体の性質との関係を検討した。それによれば、リガンド結合ドメインの反復配列の第1番と第2番の欠損では LDL との結合が正常の約70パーセントとなり、その原因は主として LDL 受容体の数の低下であった。彼らの成績とこの症例との間の違いの原因は明らかではないが、リガンド結合ドメインの一部が欠除しているのであるから、LDL 受容体の数の低下よりも親和性の低下のほうが考えやすいと思われる。これまで、LDL 受容体の活性が正常の60パーセントも認める FH ホモ接合体の報告はなく、FH ホモ接合体の LDL 受容体活性はすべて正常の10%以下と考えられていた。FH-Tonami-2 は通常の FH に比べ臨床的にも軽症で冠動脈硬化の進展も遅く、長寿の傾向があった。LDL 受容体の遺伝子や蛋白レベルの研究が進むにつれ、今後 FH-Tonami-2 のようにある程度の LDL 受容体活性を持つ FH が発見されると予想さ

れ、高コレステロール血症を示さない家族性高コレステロール血症も存在する可能性がある。臨床的には、家族性高コレステロール血症という用語は有用であるが、病因論的には‘LDL 受容体異常症’と呼ぶほうが適切であると思われる。

HaY は、妊娠時およびエストラジオール投与時に著明な LDL コレステロールの低下を示していた²⁸⁾。渡辺遺伝性高脂血症ウサギ (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, WHHL rabbit) において妊娠時に LDL 受容体活性の増加が認められ⁴⁰⁾、また肝臓癌由来の培養細胞で LDL 受容体の活性がエストロゲン (estrogen) で誘導されるとの報告がなされている⁴¹⁾。本例の皮膚線維芽細胞において培養液にエストラジオールを加えて LDL 受容体活性をみたが、活性の増加は認められなかった。その理由は、培養細胞の種類によってエストロゲンの誘導の効果が異なるためと考えられた。一般の FH では、妊娠時の LDL コレステロール低下はそれほど著明ではない。遺伝子の異常部位によりエストロゲンに対する反応が異なると思われるが、その原因は明らかではない。原因の解明に FH-Tonami-2 は有用であるかもしれない。

結 論

FH の皮膚線維芽細胞を用いて LDL 受容体の異常を蛋白レベルで検討し、以下の結果を得た。

1. ホモ接合体性 FH 4例は蛋白合成欠損型1例、転送障害型1例、結合障害型2例に分類された。ヘテロ接合体性 FH 6例は、転送障害型2例、蛋白合成欠損型または結合障害型4例であった。

2. FH-Tonami-1 は、正脂血症者よりも20kd 小さい異常な前駆体はできるが、成熟体にならずに細胞内とどまりすみやかに分解される転送障害型と考えられた。

3. FH-Tonami-2 は LDL との親和性が正脂血症者の40パーセントの異常 LDL 受容体を持つ結合障害型と考えられた。

以上のことより、日本人 FH おける LDL 受容体異常は非常に多様であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部内科学第二講座馬淵宏助教授に心から謝意を表します。貴重な症例の御教示を頂きました古賀病院内科古賀伸彦先生、滋賀医科大学第三内科日高秀樹先生、高岡市民病院内科太田正之先生、福井県立病院内科竹越忠美先生に深く感謝いたします。また多大なる御協

力を頂きました金沢大学医学部第二内科第一研究室の各位、
ならびに細胞培養に際し御協力を頂いた山下洋美嬢に感謝いたします。

本研究の一部は第21回日本動脈硬化学会総会 (東京, 1989),
平成元年度日本動脈硬化学会冬季大会 (松山, 1990) において
発表した。

文 献

- 1) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 897-930 (1977).
- 2) Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W. & Schneider, W. J.: Receptor-mediated endocytosis: Concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 1-39 (1985).
- 3) Lindgren, V., Luskey, K. L., Russell, D. W. & Francke, U.: Human gene involved in cholesterol metabolism: Chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 8567-8571 (1985).
- 4) Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Russell, D. W.: The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science*, **228**, 815-822 (1985).
- 5) Südhof, T. C., Russell, D. W., Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science*, **228**, 893-895 (1985).
- 6) Goldstein, J. W. & Brown, M. S.: Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J. Lipid Res.*, **25**, 1450-1461 (1984).
- 7) Kajinami, K., Mabuchi, H., Itoh, H., Michishita, I., Takeda, M., Wakasugi, T., Koizumi, J. & Takeda, R.: New variant of low density lipoprotein receptor gene. *FH-Tonami. Arteriosclerosis*, **8**, 187-192 (1988).
- 8) 梶波康二: LDL レセプター遺伝子異常と冠動脈硬化症, 動脈硬化, **16**, 1039-1044 (1989).
- 9) 馬淵 宏, 多々見良三, 上田幸生, 上田良成, 羽場利博, 亀谷富夫, 伊藤清吾, 小泉順二, 宮元 進, 太田正之, 竹田亮祐, 竹越忠美: 日本人の家族性高コレステロール血症の診断基準について, 日老医誌, **14**, 475-479 (1977).
- 10) 武田 健, 堀内龍也, 遠藤浩良: 線維芽細胞. 代謝, **12**, 948-958 (1975).
- 11) Havel, R. M., Eder, E. A. & Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1955).
- 12) MacFarlane, A. S.: Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature*, **182**, 52-53 (1958).
- 13) Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.*, **249**, 5153-5162 (1974).
- 14) Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Stone, N. J.: Genetics of the LDL receptor: evidence that the mutations affecting binding and internalization are allelic. *Cell*, **12**, 629-641 (1977).
- 15) Haba, T., Mabuchi, H., Yoshimura, A., Watanabe, A., Wakasugi, T., Tatami, R., Ueda, K., Ueda, R., Kametani, T., Koizumi, J., Miyamoto, S. & Takeda, R.: Effects of ML-236B (Compactin) on sterol synthesis and low density lipoprotein receptor activities in fibroblasts of patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.*, **67**, 1532-1540 (1981).
- 16) Goldstein, J. L., Basu, S. K., Brunschede, G. Y. & Brown, M. S.: Release of low density lipoprotein from its surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell*, **7**, 85-95 (1976).
- 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 18) Beisiegel, U., Schneider, W. L., Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W. & Brown, M. S.: Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probes for study of receptor-mediated, endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.*, **256**, 11923-11931 (1981).
- 19) Tolleshaug, H., Goldstein, J. L., Schneider, W. J. & Brown, M. S.: Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption

- in familial hypercholesterolemia. *Cell*, **30**, 715-724 (1982).
- 20) Tolleshaug, H., Hobgood, K. K., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutation disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell*, **32**, 941-951 (1983).
- 21) O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021 (1975).
- 22) Laskey, R. A.: The use of intensifying screen or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.*, **65**, 363-371 (1980).
- 23) Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 24) Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell*, **9**, 663-674 (1976).
- 25) Cummings, R. D., Kornfeld, S., Schneider, W. J., Hobgood, K. K., Tolleshaug, H., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptors. *J. Biol. Chem.*, **258**, 15261-15273 (1983).
- 26) Van Driel, I. R., Goldstein, J. L., Südhof, T. C. & Brown, M. S.: First cysteine-rich repeat in ligand-binding domain of low density lipoprotein receptor binds Ca^{2+} and monoclonal antibodies, but not lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17443-17449 (1987).
- 27) Scatchard, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660-672 (1949).
- 28) Mabuchi, H., Sakai, Y., Watanabe, A., Haba, T., Koizumi, J. & Takeda, R.: Normalization of low-density lipoprotein levels and disappearance of xanthoma during pregnancy in a woman with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism*, **34**, 309-315 (1986).
- 29) Mabuchi, H., Tatami, R., Haba, T., Ueda, K., Ueda, R., Kametani, T., Itho, S., Koizumi, J., Ohta, M., Miyamoto, S., Takeda, R., & Takeshita, H.: Homozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *Am. J. Med.*, **65**, 290-297 (1987).
- 30) Mabuchi, H., Koizumi, J., Shimizu, M., Takeda, R. & the Hokuriku FH-CHD Study Group: Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Circulation*, **79**, 225-332 (1989).
- 31) Funahashi, T., Miyake, Y., Yamamoto, A., Matsuzawa, Y. & Kishino, B.: Mutation of the low density lipoprotein receptor in Japanese kindreds with familial hypercholesterolemia. *Hum. Genet.*, **79**, 103-108 (1988).
- 32) Mabuchi, H., Haba, T., Tatami, R., Miyamoto, S., Sakai, Y., Wakasugi, T., Watanabe, A., Koizumi, J. & Takeda, R.: Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10 levels in patients with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 478-482 (1981).
- 33) Mabuchi, H., Sakai, T., Sakai, Y., Yoshimura, A., Watanabe, A., Wakasugi, T., Koizumi, J. & Takeda, R.: Reduction of serum cholesterol in heterozygous patients with familial hypercholesterolemia: Additive effects of compactin and cholestyramine. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 609-613 (1983).
- 34) Mabuchi, H., Kamon, N., Fujita, H., Michishita, I., Tadeka, M., Kajinami, K., Itho, H., Wakasugi, T. & Takeda, R.: Effects of CS-514 on serum lipoprotein lipid and apoprotein levels in patient with familial hypercholesterolemia. *Metabolism*, **36**, 475-479 (1987).
- 35) Yamamoto, T., Davis, C. G., Brown, M. S., Schneider, W. J., Casey, M. L., Goldstein, J. L. & Russell, D. W.: The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*, **37**, 577-585 (1984).
- 36) Esser, V., Limbird, L. E., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Russell, D. W.: Mutation analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, **263**, 13282-13290 (1988).
- 37) Davis, C. G., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., Anderson, R. G. W., Russell, D. W. & Brown, M. S.: Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by

growth factor homology region. *Nature*, 326, 760-765 (1987).

38) Esser, V. & Russell, D. W.: Transport-deficient mutations in the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, 623, 13276-13281 (1988).

39) Davis, C. G., Elhammer, A., Russell, D. W., Schneider, W. J., Kornfeld, S., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.: Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 261, 2828-2838 (1986).

40) Shiomi, M., Ito, T. & Watanabe, Y.: Increase in hepatic low-density lipoprotein receptor activity during pregnancy in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits; an animal model for familial hypercholesterolemia. *Biochim. Biophys. Acta*, 917, 92-100 (1987).

41) Semenkovich, C. F. & R. E. Ostland, Jr.: Estrogens induce low-density lipoprotein receptor activity and decrease intracellular cholesterol in human hepatoma cell line Hep G2. *Biochemistry*, 26, 4987-4992 (1987).

Biosynthesis of Low Density Lipoprotein Receptor in the Fibroblasts from Patients with Familial Hypercholesterolemia Hajime Fujita, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Sco., 99, 302—314 (1990)

Key words familial hypercholesterolemia (FH), low density lipoprotein (LDL) receptor, biosynthesis of LDL receptor protein, FH-Tonami-1, FH-Tonami-2

Abstract

Abnormalities of the low density lipoprotein (LDL) receptor in 10 Japanese patients with familial hypercholesterolemia (FH) were studied. Human fibroblasts were obtained from the skin of these patients, and homozygous FH and heterozygous FH were distinguished by measuring the receptor binding activity, internalization, and degradation of ¹²⁵I-LDL, and by the gene analysis of the LDL receptor. The biosynthesis of the LDL receptor was analyzed by the incorporation of ³⁵S-methionine followed by immunoprecipitation with anti-LDL receptor antibody (IgG-C7). Of the 4 patients with homozygous FH, one showed null alleles, one transport-deficient alleles, and two showed binding-deficient alleles. Of the 6 patients with heterozygous FH, two showed transport-deficient alleles, and four showed null alleles or binding-deficient alleles. FH-Tonami-1 is known to delete exon 15. The skin fibroblasts from FH-Tonami-1 patients synthesized the precursor of the LDL receptor, with a molecular weight 20 kilodaltons, to smaller than normal, in SDS polyacrylamide gel electrophoresis, the precursor was not converted into a mature form and degraded for 8 hours. FH-Tonami-2 is known to delete exon 2 and exon 3. The skin fibroblasts from FH-Tonami-2 patients synthesized the LDL receptor, to an affinity of only 40 percent of normal. Thus, these mutations of the LDL receptor with FH are suggested to be heterogeneous.